



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

fenlegungsschr
(10) DE 196 28 454 A 1

(51) Int. Cl. 6:

C 08 B 37/04

B 01 F 17/52

D 06 L 1/12

C 12 P 19/04

C 12 N 1/20

A 23 L 1/035

B 09 C 1/10

C 02 F 1/00

A 61 K 7/48

A 61 K 9/107

C 11 D 3/37

C 14 C 5/00

(21) Aktenzeichen: 196 28 454.6
 (22) Anmeld. tag: 15. 7. 96
 (23) Offenlegungstag: 29. 1. 98

(51) // (C12P 19/04,C12R 1:38) (C12P 19/04,C12R 1:385) (C12N 1/20,C12R 1:38) (C12N 1/20,C12R 1:385) C07H 15/04

(71) Anmelder:

MFH Marienfelde GmbH Unternehmen für Hygiene,
 22761 Hamburg, DE

(74) Vertreter:

Blumbach, Kramer & Partner, 81245 München

(82) Teil in: 196 54 942.6

(72) Erfinder:

Eliseev, Serguei, Dr., 22457 Hamburg, DE; Shulga, Alexander, Dr., Lviv, UA; Karpenko, Elena, Dr., Lviv, UA; Bolochovskaia, Valentina, Dr., Ladyzhin, UA

(56) Entgegenhaltungen:

DE-AS 21 50 375

CLARE,K. »Alginic in: Industrial Gums- Poly-
saccharides and Derivatives, Editor:Whistler,R.L. and BeMiller,J.N., San-Diego,
Academic Press, Inc.1993, S.141/142;Datenbank BIOSIS auf STN: The BIOSIS Previews
(R)/RN, AN 95:367959, AB, Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States
of America, 1995, 92 (14), 6424-28;

Fat.Sci., Technol., 1987, 89, 586-591;

Fat.Sci., Technol., 1989, 91, 363-366;

Biodegradation, 1990, 1, 107-119;

Can.J., Microbiol, 1993, 39, 1071-78;

World Journal of Microbiology and Biotechnology,
1991, 7, 80-88;

J.Chem.Tech.Biotechnol., 1994, 59, 53-59;

Adv.Micr.Phys., 1982, 23, 80-142;

Carbohydrate Polymers, 1988, 161-181;

Enzyme Microb. Technol., 1990, 12, 794-799;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe, deren mikrobielle Herstellung mit dafür geeigneten
Mikroorganismen und ihre Anwendung

(57) Die Erfindung betrifft Rhamnolipid-Alginatpolymer-Kom-
plexe, Verfahren zu deren Herstellung unter Zuhilfenahme
von Bakterien und für das Herstellungsverfahren geeignete
Bakterien sowie auch die Verwendung der Rhamnolipid-Al-
ginatpolymer-Komplexe.

DE 196 28 454 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 97 702 065/33

14/33

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe erzeugende bakterielle Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas* sowie ein Verfahren zu deren Herstellung, Gewinnung und Vermehrung. Die Erfindung betrifft außerdem ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen unter Verwendung von Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas* sowie neue Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe. Die Erfindung betrifft weiter Konzentrate und Lösungen von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen mit oberflächenaktiven Eigenschaften sowie durch derartige Konzentrate oder Lösungen stabilisierte Emulsionen. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen enthaltenden Konzentraten und Lösungen zur Stabilisierung von Emulsionen. Diese Verwendung kann in den unterschiedlichsten technischen Bereichen zu Einsatz kommen.

Bakterien des Genus *Pseudomonas* sind bekanntermaßen aerob lebende, gramnegative, zur Familie der *Pseudomonadaceen* gehörende Bakterien, die meist polar begeißelt sind und optisch an ihrer Form (gerade oder schwach gekrümmte Stäbchen) erkannt werden können. Wie verschiedene andere Mikroorganismen-Genera, sind auch Bakterien des Genus *Pseudomonas*, insbesondere einige Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*, in der Lage, Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle zu assimilieren und in wertvolle Substanzen, beispielsweise in hochaktive Biotenside, umzuwandeln. Das Züchten von Bakterien des Genus *Pseudomonas*, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa*, unter Herstellung derartiger Biotenside, beispielsweise unter Herstellung von Rhamnolipiden, ist Gegenstand zahlreicher Druckschriften wie beispielsweise DE-A 21 50 375; "F. Wagner; in: Strategies for Biosurfactant Production; Fat Sci. Technol. 89 (1987), 586—591"; "S. Lang et al.; in: Antimicrobial Effects of Biosurfactants; Fat Sci. Technol. 91 (1989), 363—366"; "R. K. Hommel; in: Formation and Physiological Role of Biosurfactants produced by Hydrocarbonutilizing microorganisms; Biodegradation 1 (1990), 107—119"; "M. I. van Dyke et al.; in: *Pseudomonas aeruginosa* UG2 Rhamnolipid Surfactants; Can. J. Microbiol. 39 (1993), 1071—1078" und darin zu findende Zitate. Aus den genannten Druckschriften und weiterem, nachfolgend zitiertem Stand der Technik ist auch bekannt, daß durch Züchten von Bakterien des Genus *Pseudomonas* gewonnene Rhamnolipid-Biotenside für die Reinigung von Öltanks oder die Aufarbeitung von Bodenmaterial effizient verwendet werden können, das durch Öl kontaminiert wurde (siehe stellvertretend für weitere Druckschriften: "I. M. Banat et al.; in: Biosurfactant Production and Use in Oil Tank Clean-up; World Journal of Microbiology and Biotechnology 7 (1991), 80—88"; und "K. Scheibenbogen; in: Enhanced Removal of Selected Hydrocarbons from Soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 Biosurfactants and Some Chemical Surfactants; J. Chem. Tech. Biotechnol. 59 (1994), 53—59").

Die in den genannten Dokumenten beschriebenen Rhamnolipide haben eine Struktur, die aufgebaut ist aus einem (oder mehreren, gegebenenfalls glykosidisch verknüpften) Rhamnose-Resten und regelmäßig mehreren, mehr als 8 Kohlenstoffatome aufweisenden Hydroxyfettsäure-Resten, die über Kohlenstoffatome in α -Stellung zur Carboxyl-Gruppe an die Rhamnose-Reste gebunden sind und untereinander über die Hydroxygruppe esterartig verknüpft sein können.

Aus dem Stand der Technik ("L. W. Sutherland; in: Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides; Adv. Micr. Phys. 23 (1982), 80—142"; "P. Gacesa; in: Alginates; Carbohydrate Polymers (1988), 161—181"; "L. O. Martins; in: Roles of Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} in Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*; Enzyme Microb. Technol. 12 (1990), 794—799") war ebenfalls bekannt, daß *Pseudomonas aeruginosa* ein extrazelluläres Alginat-Polysaccharid im Wege der Assimilation geeigneter Kohlenstoffquellen erzeugen kann. Dieses konnte in zellfreien Medien der Züchtung von *Pseudomonas aeruginosa* unter geeigneten Bedingungen nachgewiesen werden. Auch dieses Produkt entfaltet vorteilhafte Eigenschaften, war aber bisher im Zusammenhang mit Rhamnolipiden, insbesondere von durch *Pseudomonas aeruginosa* erzeugten Rhamnolipiden, nicht bekannt.

Die hervorragenden Tensid-Eigenschaften von Rhamnolipiden lassen sich zum Beispiel an den Werten der kritischen Micell-Konzentration (CMC) an der Oberfläche von beispielsweise 0,01 bis 1 g/l und der Grenzflächen-CMC-Werte von beispielsweise 0,005 bis 0,2 g/l (gegen Hexadecan) und an den Werten der Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser von beispielsweise etwa 70 auf etwa 35 mN/m erkennen (van Dyke et al., a.a.O.). Diese Eigenschaften machen die genannte Verbindungsklasse zu einer bevorzugten Zielgruppe biotechnologischer Synthesen, da die mikrobiologischen Verfahren leicht im industriellen Maßstab unter Verwendung preiswerter Ausgangssubstrate hergestellt werden können und zu Produkten führen, die sich durch hohe Effizienz selbst in niedrigen Konzentrationen, durch ihre biologische Abbaubarkeit und durch ihre geringe Toxizität auszeichnen. Durch den preiswerten Erhalt derartiger Biotenside werden neue Wege zu Biotensiden eröffnet, die Anwendung finden können in den technischen Bereichen Reinigung (einschließlich Beseitigung von hydrophoben Kohlenwasserstoff-Kontaminationen mit wäßrigen Medien und Textilreinigung mit wäßrigen Medien), Baustoffe, Metallverarbeitung, Herstellung von Kosmetika, Lebensmitteln und Arzneimitteln sowie Mitteln zur Schädlings- und Unkrautbekämpfung, um nur einige beispielhaft zu nennen.

Eine Aufgabe der Erfindung war, einen neuen Mikroorganismus des Genus *Pseudomonas* bereitzustellen, der im Rahmen seines Stoffwechsels Biotenside, insbesondere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe zu erzeugen vermag. Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, ein Verfahren zur Herstellung bzw. Gewinnung des neuen Mikroorganismus des Genus *Pseudomonas* anzugeben, insbesondere ein solches Verfahren, das leicht und im Rahmen bisher bekannter Technologien unter Verwendung preiswerter Substrate durchgeführt werden kann.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, ein Verfahren anzugeben, das zu neuen, mikrobiologisch herstellbaren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen mit guten Tensid-Eigenschaften führt, sowie derartige neue Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe mit guten Tensid-Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Noch eine Aufgabe der Erfindung war, Konzentrate und Lösungen bzw. flüssige Systeme wie beispielsweise Emulsionen bereitzustellen, die als oberflächenaktiv wirksame Substanzen neue Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe enthalten. Ebenfalls war es Aufgabe der Erfindung, Verwendungen von Rhamnolipid-Alginatpoly-

mer-Komplexe enthaltenden Konzentraten, Lösungen oder anderen Systemen einzugeben, beispielsweise zur Stabilisierung von Emulsionen oder Ermöglichung von technischen Vorgängen, die bisher nicht, nicht mit der gewünschten Effizienz oder nur unter Inkaufnahme einer Schädigung der Umwelt durchgeführt werden konnten.

Überraschend wurde nämlich gefunden, daß sich mit einem neuen Bakterium des Genus *Pseudomonas*, das unter Anwendung herkömmlicher Techniken auf preiswert erhältlichen Substraten gezüchtet werden kann, neue Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe auf biotechnologischem Weg herstellen lassen. Diese neuen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe sind hinsichtlich ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften mit bisher bekannten Rhamnolipiden vergleichbar oder übertreffen diese sogar. Zudem lassen sich teilweise als Abfallstoffe in industriellen Kreisläufen anfallende Substanzen als Kohlenstoff-Quellen verwenden und führen diese einer sinnvollen Nutzung zu. Die erhaltenen neuen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe sind insbesondere biologisch abbaubar und toxikologisch völlig unbedenklich, was sie selbst in sensiblen industriellen Bereichen wie der Kosmetik-Industrie oder der Lebensmittel-Technologie verwendbar macht.

Die Erfindung betrifft zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigte Bakterien des Genus *Pseudomonas* gemäß Patentanspruch 1.

Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Gewinnung eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* gemäß der nachfolgenden Spezifikation nach Patentanspruch 5.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Vermehrung eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* gemäß der nachfolgenden Spezifikation nach Patentanspruch 6.

Die Erfindung betrifft auch ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen unter Fermentation eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* gemäß der nachfolgenden Spezifikation nach Patentanspruch 12.

Weiter betrifft die Erfindung Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe aus Bausteinen der Struktur nach Patentanspruch 20.

Die Erfindung betrifft zudem einen oder mehrere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) gemäß der nachfolgenden Spezifikation enthaltende wäßrige Konzentrate, Emulsionen oder Lösungen nach den Patentansprüchen 23, 24 oder 25.

Letztlich betrifft die Erfindung auch Verwendungen der vorstehend genannten, einen oder mehrere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) gemäß der nachfolgenden Spezifikation enthaltende wäßrige Konzentrate, Emulsionen oder Lösungen gemäß den Patentansprüchen 26 und 29 bis 34.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das erfindungsgemäße, zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigte Bakterium gehört zum Genus *Pseudomonas*. Es wurde im Rahmen der Erfindung überraschend gefunden in Bodenproben aus dem Erdöl-Fördergebiet Borislav, westliche Ukraine. Das Bakterium wurde gewonnen unter Anwendung folgender Verfahrensweise: Für die Haltung des Bakteriums (*Pseudomonas aeruginosa*) in einem Schrägagar-Röhrchen wurde die Standard-Nährbouillon der Firma Merck (Darmstadt) mit der nachfolgenden Zusammensetzung und unter Zusatz von 1,5% Bacto Agar® (Firma Difco, Detroit, U.S.A.) verwendet. Das Medium wurde nach der mitgelieferten Vorschrift angesetzt und hatte nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,0. Das gleiche Medium wurde auch für die Herstellung von Agarplatten verwendet. Das Medium hatte die folgende Zusammensetzung (Mengenangaben in g/l): Mannit: 20,0; NaNO₃: 10,0; CaCl₂ · 2 H₂O: 0,1; MgSO₄ · 7 H₂O: 0,4; Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB): 0,2; Methylenblau: 0,005; Na₂HPO₄ · 2 H₂O: 0,44; KH₂PO₄: 0,34; Agar: 15,0; Spurensalze (2 ml/l): FeSO₄ · 7 H₂O: 2,0; MnSO₄ · H₂O: 1,5; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O: 0,6.

Zur Beurteilung der Reinheit der verwendeten Kulturen wurden in zeitlichen Abständen mikroskopische Betrachtungen durchgeführt. Daneben wurden Verdünnungsreihen in steriler Salzlösung angelegt, aus denen Proben auf Agarplatten ausgespätet wurden. Nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C wurden nur im Aussehen einheitlich gewachsene Kulturen als reine Kulturen gewertet.

Rhamnolipide wurden über die Bildung von Ionenassoziaten mit Methylenblau in Gegenwart des Kationentensids (CTAB) erfaßt. Diese Methode wurde auch auf die Anwendung auf Agarplatten übertragen: Die Agarplatten waren hellblau gefärbt, und bei Bildung von Rhamnolipiden bilden sich dunkelblaue Höfe um die Kolonien. Die Hofgröße war der Rhamnolipid-Konzentration proportional, wie sich beim Auftragen verschiedener Rhamnolipid-Konzentrationen herausstellte. Die Agarplatten mit Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* gemäß der Erfindung wurden bei 30°C inkubiert. Nach Anwachsen der Kolonien (48 h) konnte die Nachweisreaktion beobachtet werden.

Proben des Bakteriums konnten anhand folgender Eigenschaften charakterisiert werden:

- Individuen: einzellig;
- Form: Stäbchen (siehe Fig. 1);
- Größe: Länge 1,5 bis 4,0 µm; Breite: 0,8 bis 0,9 µm;
- Geißeln: polar 1;
- Bewegung: festgestellt (+);
- Gramverhalten: Gram-negativ;
- Lyse durch 3% KOH: +;
- Aminopeptidase (Cerny): +;
- Sporen: keine (−);
- Oxidase: +;
- Catalase: +;
- ADH: +;

— NO_2 aus NO_3 : +;

— Urease: +;

— Hydrolyse von Gelatine: +;

— aerob;

5 — Substratverwertung:

Adipat: +;

Citrat: +;

Malat: +;

D-Glucose: +;

10 Mannitol: +;

Acetamid: +;

Geraniol: +.

Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

Die partielle Sequenzierung der 16SrDNA ergab eine hohe Ähnlichkeit mit derjenigen dieser Art.

15 Erfindungsgemäß sind identische Bakterien des Genus *Pseudomonas* auch dadurch erhältlich, daß man ein Bakterium des Genus *Pseudomonas*, beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, unter Schütteln (200 Upm) auf einem Kulturmedium folgender Zusammensetzung züchtet (Angaben der Mengen in g/l): NaNO_3 : 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$: 2,0; KH_2PO_4 : 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,5; Na-citrat: 5,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,0005; CaCl_2 : 0,5; Kohlenstoffquelle: 20,0.

20 Die vorstehend genannten Bakterien des Genus *Pseudomonas* mit identischen morphologischen und physiologischen Eigenschaften und gleicher Fähigkeit zur Bildung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Konzentraten wurden mit der Bezeichnung ID 96-115 versehen und am 23. Februar 1996 bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554 hinterlegt.

Erfindungsgemäß wurden derartige Bakterien des Genus *Pseudomonas*, die zur Erzeugung von Rhamnolipid-

25 Alginatpolymer-Komplexen befähigt sind, aus Bodenproben aus dem Erdöl-Fördergebiet Borislav, westliche Ukraine. Die Gewinnung erfolgt nach dem oben beschriebenen Verfahren.

Die erfindungsgemäßen, zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakterien des Genus *Pseudomonas* lassen sich im Rahmen eines üblichen Verfahrens zur Züchtung von Bakterien, beispielsweise in einer bewegten Submerskultur, dadurch züchten bzw. vermehren, daß man

30 — ein wässriges, mindestens eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, mindestens eine assimilierbare Stickstoffquelle und an sich bekannte Nährsalze in geeigneten Konzentrationen enthaltendes Nährmedium herstellt und dieses sterilisiert;

35 — das so erhaltene Nährmedium mit einem Bakterium des Genus *Pseudomonas* beimpft, das wie vorstehend beschrieben aus einer Bodenprobe gewonnen wurde oder im Rahmen beispielsweise eines Mutationsverfahrens aus *Pseudomonas aeruginosa* hergestellt wurde, und

— das Bakterium des Genus *Pseudomonas* bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5,

— und bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 35°C,

— aerob in bewegter Submerskultur züchtet.

40 Bevorzugt wird erfindungsgemäß das mit Fähigkeit zur Bildung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen ausgestattete Bakterium des Genus *Pseudomonas* verwendet, das mit der Bezeichnung ID 96-115 versehen und am 23. Februar 1996 bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554 hinterlegt wurde. Dieses Bakterium ist besonders gut zur Bildung des erstrebten Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexes in der Lage und kann zudem eine große Zahl wirtschaftlich interessanter Kohlenstoffquellen assimilieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als assimilierbare Kohlenstoffquelle eine oder mehrere Verbindungen aus der aus Glucose, Xylose, Maltose, Saccharose, Mannit, Glycerin, Ethanol, n-Paraffine, Natriumcitrat, Natriumacetat, Natriumsuccinat und Fettsäureester bestehenden Gruppe verwendet.

50 Besonders bevorzugt als assimilierbare Kohlenstoffquelle eignen sich pflanzliche Öle einzeln oder in Mischungen, wobei Rapsöl als ein preiswert erhältliches, regenerierbares Produkt besonders bevorzugt ist und hervorragende Ergebnisse liefert. Weiter besonders bevorzugt sind Abfälle aus der Margarine-Produktion. Auch diese liefern nicht nur gute Ergebnisse bei der Fermentierung, sondern fallen auch als Abfallprodukte industrieller Verfahren, die sonst aufwendig entsorgt werden müßten, preiswert an.

55 Die genannten Kohlenstoffquellen sind in der Nährösung in für die Fermentation geeigneten Mengen zugegen. Diese liegen bevorzugt bei 10 bis 50 g/l, noch mehr bevorzugt bei etwa 15 bis 25 g/l, besonders bevorzugt bei etwa 20 g/l, der Nährösung.

Als Stickstoffquelle können die üblichen anorganischen und/oder organischen Stickstoffquellen verwendet werden, wie sie allgemein in Fermentationsverfahren Anwendung finden. Beispiele geeigneter Stickstoffquellen sind Nitrate, Ammoniumsalze, Harnstoff und Pepton. Aminosäuren sind für das Wachstum der Bakterien in dem erfindungsgemäßen Fermentationsverfahren nicht essentiell.

Die genannten Stickstoffquellen sind in der Nährösung in für die Fermentation geeigneten Mengen zugegen. Diese liegen bevorzugt bei 1 bis 5 g/l, noch mehr bevorzugt bei 2 bis 4 g/l, besonders bevorzugt bei etwa 3 g/l, der Nährösung.

65 Neben den vorstehend genannten Kohlenstoffquellen und Stickstoffquellen werden dem Nährmedium bzw. der Fermentationsbrühe noch anorganische und/oder organische Salze zugesetzt, wie dies dem Fachmann bekannt ist. Beispiele geeigneter Verbindungen (ohne auf diese beschränkt zu sein) sind Phosphate wie Dialkaliumhydrogenphosphat-trihydrat (z. B. in einer Menge von 1 bis 5 g/l, besonders von etwa 2 g/l), Kaliumhydrogen-

phosphat (z. B. in einer Menge von 1 bis 5 g/l, besonders von 1,5 g/l); Sulfate wie Magnesiumsulfatheptahydrat (z. B. in einer Menge von 0,1 bis 1 g/l, besonders von etwa 0,5 g/l); Chloride wie Calciumchlorid (z. B. in einer Menge von 0,01 bis 0,1 g/l, besonders von etwa 0,05 g/l); Eisensalze wie Eisensulfat-heptahydrat (z. B. in einer Menge von 0,0001 bis 0,001 g/l, besonders von etwa 0,0005 g/l); Calciumsalze wie das vorstehend genannte Calciumchlorid; Salze organischer Säuren wie Natriumcitrat (z. B. in einer Menge von 1 bis 10 g/l, besonders von etwa 5 g/l); usw. Auch andere, für die Fermentation an sich bekannte Zusätze wie beispielsweise Puffer-Substanzen können in den dem Fachmann geläufigen Mengen verwendet werden, ohne daß es an dieser Stelle der Erwähnung bedarf.

Der pH-Wert der Nährösung bewegt sich während des erfindungsgemäßen Verfahrens im Bereich 6,5 bis 7,5, bevorzugt im Bereich von 6,8 bis 7,2, und in stationärer Phase im Bereich von 8,0 bis 9,0.

Das erfindungsgemäße Fermentationsverfahren zur Vermehrung des zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* gemäß der Erfindung wird unter den vorstehend genannten Bedingungen für eine Zeit zwischen 0,5 und 5 Tagen durchgeführt. Die logarithmische Wachstumsphase erreicht das System etwa nach 20 Stunden.

Wie bereits oben angesprochen, sind die erfindungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe als Stoffwechselprodukte der gemäß der Erfindung bereitgestellten neuen Bakterien des Genus *Pseudomonas* anzusehen. Das erfindungsgemäße mikrobiologische Verfahren zur Herstellung umfaßt damit die Schritte, daß man

- ein wäßriges, mindestens eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, mindestens eine assimilierbare Stickstoffquelle und an sich bekannte Nährsalze in geeigneten Konzentrationen enthaltendes Nährmedium herstellt und dieses sterilisiert;
- das so erhaltene Nährmedium mit einem Bakterium des Genus *Pseudomonas* beimpft, das wie vorstehend beschrieben aus einer Bodenprobe gewonnen wurde oder im Rahmen beispielsweise eines Mutationsverfahrens aus *Pseudomonas aeruginosa* hergestellt wurde;
- das Bakterium des Genus *Pseudomonas* bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 und bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 35°C aerob in bewegter Submerskultur züchtet;
- die Zellen des Bakteriums des Genus *Pseudomonas* auf an sich bekannte Weise von dem wäßrigen Medium abtrennt; und gegebenenfalls
- die Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe aus dem zellfreien wäßrigen Medium gewinnt.

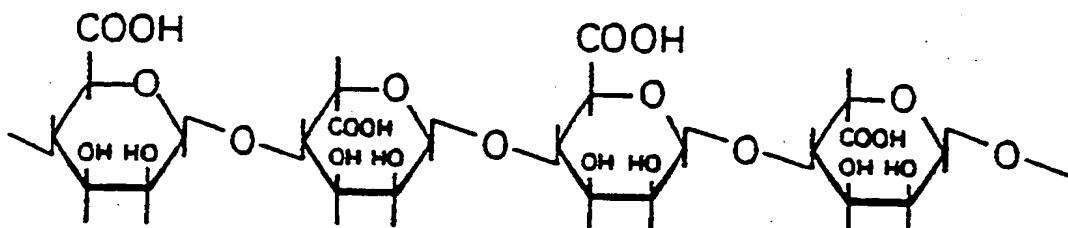
Die ersten vier Schritte des Verfahrens verlaufen also gleich den Schritten der Züchtung bzw. Vermehrung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas*; die oben genannten Schritte wie auch die oben beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen dieser Schritte sind also gleichverlaufend den Schritten der Herstellung der neuen erfindungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe, und es kann auf eine erneute Beschreibung an dieser Stelle verzichtet werden.

Nach Abschluß des Herstellungsvorfahrens werden die Zellen des Bakteriums des Genus *Pseudomonas* auf an sich bekannte Weise von dem wäßrigen Medium der Nährösung abgetrennt. Dies kann in bevorzugter Weise geschehen durch Abzentrifugieren der Zellen von der wäßrigen Phase oder durch Membranfiltration. Es sind jedoch auch andere Trennverfahren anwendbar.

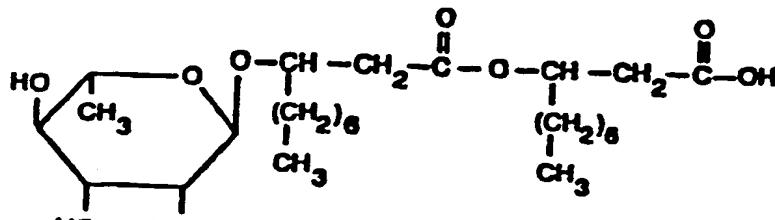
Gegebenenfalls können die erfindungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe aus dem so erhaltenen zellfreien wäßrigen Medium isoliert werden. Auch hierbei kommen an sich bekannte herkömmliche Verfahren zur Anwendung. Als Beispiele seien Verfahren unter Gefriertrocknen oder Ausfallen aus der Lösung genannt. Wenn die Produkte aus der wäßrigen Lösung ausgefällt werden, wird hierzu in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens die wäßrige Lösung z. B. mit 0,5 N HCl angesäuert, beispielsweise auf einen pH-Wert von etwa 3,5, und im Verlauf von 2 Stunden abgekühlt, beispielsweise auf eine Temperatur von 15°C. Das ausgefallene Produkt wird in an sich bekannter Weise abfiltriert oder abzentrifugiert.

Auf diese Weise werden die neuen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe gemäß der Erfindung gewonnen. Diese sind aus Bausteinen der folgenden Strukturen aufgebaut:

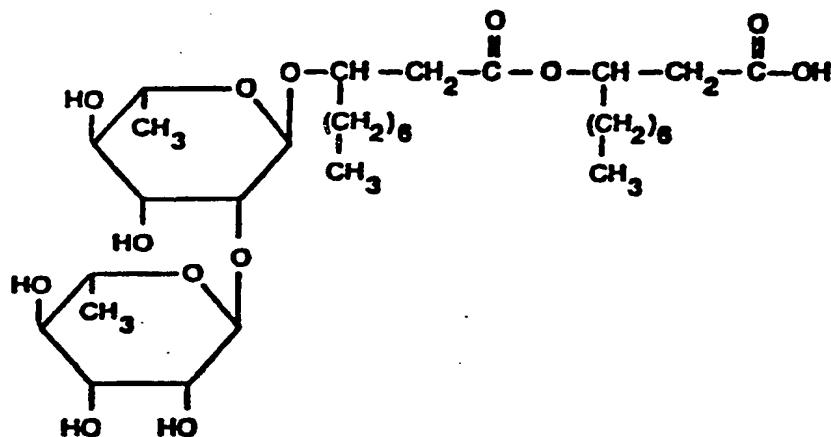
- Alginatpolymer-Komponente (Alg): 1,4-verknüpftes Copolymer aus β -D-Mannuronsäure und seinem C5-Epimer α -L-Guluronsäure:



- Rhamnolipid-Komponente I (RL I): α -L-Rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanäure



— Rhamnolipid-Komponente II (RL II): α -L-Rhamnosyl- α -L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyle-hydroxydecanoate



35 Nachweislich sind in den erfindungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen gemäß der Erfindung zwei Rhamnolipid-Komponenten der Strukturen RL—I und RL—II und eine Alginatpolymer-Komponente der Struktur Alg enthalten. Erfindungsgemäß sind besonders bevorzugt die Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe, wie sie nach dem oben beschriebenen Verfahren als Stoffwechselprodukte des Bakteriums des Genus *Pseudomonas* erhältlich sind, insbesondere des Bakteriums mit der Bezeichnung ID 96-115, wie es am 23. 40 Februar 1996 bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554 von der Anmelderin hinterlegt wurde.

45 Die Analyse der erfindungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe erfolgt nach an sich bekannten Methoden. So kann der Rhamnolipid-Gehalt bestimmt werden durch Abnahme eines aliquoten Teils (z. B. 10 bis 50 ml) der zellfreien Kulturbrühe, mehrmaliges Extrahieren der abgenommenen Menge mit einem organischen Lösungsmittel (z. B. mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ im Volumenverhältnis 2 : 1), Vereinigen der organischen Extrakte und Abziehen des organischen Lösungsmittels. Durch Zusatz von Anthron wird ein Komplex mit der Rhamnose-Komponente des Komplexes hergestellt, dessen Konzentration photometrisch gegen eine Standardreihe bekannter Konzentrationen gemessen werden kann.

50 Der Alginatgehalt wird beispielsweise gravimetrisch nach Fällung des Komplexes mit Isopropanol in Doppelbestimmungen ermittelt. Dazu wird ein aliquoter Teil der zellfreien Kulturbrühe, z. B. 10 bis 50 ml, mit 2 Teilen Isopropanol versetzt. Nach Abschluß der Fällungsreaktion wurde das Alginat 15 min bei $15.000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, und das Pellet wurde mit 70% (v/v) Isopropanol gewaschen, 48 h bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet und gewogen. Die erfindungsgemäßen Komplexe sind außerdem charakterisiert durch Elementaranalysen, IR-Absorptionsspektren und andere spezifische physikalisch-chemische Methoden wie Tensiometrie, Rheologie, Dünnschichtchromatographie, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektroskopie. Folgende Komponenten der Komplexe lassen sich identifizieren:

60

65

(a) Rhamnolipid I (RL I):	CMC:	50 g/l;
	σ_s :	29,5 nN/m;
	σ_i :	0,020 nN/m (n-Heptan);
(b) Rhamnolipid II (RL II):	CMC:	20 g/l;
	σ_s :	28,8 nN/m;
	σ_i :	0,014 nN/m (n-Heptan);
(c) Alginat-Polymer (Alg):	MG:	ca. 400.000.

Für die praktische Anwendung werden erfahrungsgemäß wäßrige Konzentrate bereitgestellt, die einen oder mehrere erfahrungsgemäße(n) Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) der oben angegebenen Struktur enthalten. In diesen wäßrigen Konzentraten beträgt der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) 6,0 bis 12,0 g/l.

Alternativ können erfahrungsgemäß wäßrige Lösungen vorgesehen werden, die entweder die wäßrigen Systeme nach Abtrennen der Zellen sind, wie sie als Ergebnis des oben beschriebenen Herstellungsverfahrens entstehen, oder solche wäßrigen Lösungen, wie sie beispielsweise durch Verdünnen der oben beschriebenen Konzentrate erhalten werden können. Diese wäßrigen Lösungen enthalten einen oder mehrere erfahrungsgemäße(n) Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) der oben angegebenen Struktur. In diesen wäßrigen Lösungen beträgt der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) 0,1 bis 15 Gew.-%.

Unter die Erfahrung fallen auch Emulsionen auf wäßriger Basis, die einen oder mehrere erfahrungsgemäße(n) Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) der oben angegebenen Struktur enthalten. In diesen wäßrigen Emulsionen beträgt der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) 0,05 bis 5 Gew.-%. Die genannten Emulsionen können neben den genannten Komponenten beispielsweise noch Öle, Fette oder andere Komponenten enthalten, die nicht oder nur unzureichend mit Wasser mischbar sind, solange nicht die oberflächenaktiv wirksamen erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe der oben angegebenen Struktur zugegen sind, die jedoch in der wäßrigen Phase eine stabile Emulsion in Gegenwart der erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe bilden.

Die vorgenannten Konzentrate, Lösungen oder Emulsionen können in einer Vielzahl von Verwendungen eingesetzt werden. Ein Beispiel ist — ohne auf dieses beschränkt zu sein — die Reinigung von Textilien. So können in bevorzugten Anwendungen Textilien aus den verschiedensten Materialien wie Wolle, Fell, Leder, Kunstleder, Baumwolle, Seide, Kunstseide oder Leinen von auf herkömmlichen Wegen nur schlecht oder gar nicht zu beseitigenden Verunreinigungen wie tierischen, pflanzlichen oder mineralischen Fetten, Ölen, Blut, Lanolin usw. befreit werden. Bei der Reinigung kommen im wesentlichen wäßrige, die erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe enthaltende Lösungen zur Einwirkung.

Eine weitere, mit Vorteil zu sehende Verwendung gemäß der Erfahrung liegt in der Reinigung von Bodenmaterial wie beispielsweise Erde, Sand, Kehrgut, Gestein o. ä. von Fetten oder Ölen, beispielsweise von kontaminierenden mineralischen Ölen. Eine solche Verwendung kann eine Rolle spielen bei Auslaufen oder Lecken von ölfüllten Behältern oder bei Unfällen, bei denen Öl in die Umwelt gelangt. Mit Hilfe der erfahrungsgemäßen Konzentrate oder Lösungen können mit hoher Effizienz beispielsweise mineralische Öle in wäßrigen Reinigungsphasen emulsionsartig gebunden werden. Die hervorragenden oberflächenaktiven Eigenschaften der erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe führen zu einer weit besseren Aufnahme der Öl-Verschmutzungen in die wäßrige Phase. Die Effizienz herkömmlicher Produkte kann dabei deutlich übertragen werden.

Die gleiche überraschende Wirkung kann auch erzielt werden bei der Verwendung der die erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe enthaltenden Konzentrate oder Lösungen zur Reinigung von Anlagen, Maschinen, Maschinenteilen, Werkzeugen und Instrumenten. Insbesondere empfindliche Instrumente wie ärztliche Instrumente können unter Verwendung der erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe mit großem Vorteil behandelt und gereinigt werden.

Überraschend wurde auch gefunden, daß bei Umweltkatastrophen unter Beteiligung von Öl in Mitleidenschaft gezogene Tiere wie beispielsweise Vögel in schonender und den Tierkörper nicht schädigender Weise mit wäßrigen Lösungen, die die erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe enthalten, behandelt und so von Ölrußständen befreit werden können. Die natürlichen Biotenside wirken insbesondere der für Wassertiere lebensnotwendigen Rückfettung des Federkleides bzw. der Haut nicht entgegen, so daß eine weit größere Überlebensrate erzielt werden kann als bei Anwendung herkömmlicher Reinigungsmittel.

Weitere bevorzugte Verwendungen gemäß der Erfahrung ergeben sich ebenfalls aus den hocheffizienten oberflächenaktiven Eigenschaften der erfahrungsgemäßen Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe und der Tatsache, daß sie untoxisch und unter biologischen Bedingungen abbaubar sind. Sie lassen sich nämlich mit Vorteil auch in der Lebensmitteltechnologie und in der Kosmetik als effiziente Emulgatoren für die Emulgierung von Fettphasen und wäßrigen Phasen ineinander verwenden.

Die Erfahrung wird durch die nachfolgend n Beispiele näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Beispiele 1 bis 4

Der erfindungsgemäße Stamm *Pseudomonas aeruginosa* DSM 10554 wurde in einem Nährmedium folgender Zusammensetzung in Schüttelkultur (200 Upm) bei 30°C für die in der nachfolgenden Tabelle 1 angegebene Zeit gezüchtet (Angaben der Mengen in g/l):

NaNO₃: 3,0;
 K₂HPO₄ · 3 H₂O: 2,0;
 KH₂PO₄: 1,5;
 10 MgSO₄ · 7 H₂O: 0,5;
 Na-citrat: 5,0;
 FeSO₄ · 7 H₂O: 0,0005;
 CaCl₂: 0,5;
 Kohlenstoffquelle: 20,0.

15 Die in den einzelnen Beispielen verwendete Kohlenstoffquelle ist in Tabelle 1 angegeben.
 20 Die Kultivierung wurde nach der in Tabelle 1 angegebenen Zeit abgebrochen, und die Kulturbrühe wurde von Zellen des Mikroorganismus befreit.
 Der Gehalt an Rhamnolipid-Alginat-Biopolymer-Komplex (RABK) ist in Tabelle 1 angegeben. Angegeben in Tabelle 1 sind auch die Werte oberflächenaktiven Spannung σ_2 und der grenzflächenaktiven Spannung σ_i der zellfreien Kulturbrühe. Letztere wurden bestimmt nach Standardverfahren (Ringmeßmethode), die dem Fachmann bekannt sind und daher keiner detaillierten Erläuterung bedürfen.

Tabelle 1

25

Bsp.	Kohlenstoffquelle	Dauer (h)	RABK-Konz. (g/l)	σ_2 (mN/m)	σ_i (mN/m)
1	Rapsöl	120	11,0	28,8	0,06
2	Ethanol	96	9,5	29,5	0,07
3	Glukose	72	6,1	30,1	0,10
4	Glycerin	96	12,5	29,5	0,02

45 Die Beispiele 1 bis 4 zeigen, daß auf der Grundlage einfach zugänglicher Kohlenstoffquellen, die teilweise als Industrieabfälle zugänglich sind, eine hohe Biotensid-Konzentration in der Kulturbrühe erhalten werden kann, die gute oberflächenaktive Eigenschaften zeigt.

50

Beispiel 5

Mit dem gemäß den Beispielen 1 bis 4 erhaltenen Rhamnolipid-Alginat-Biopolymer-Komplex (RABK) wurden die oberflächenaktiven Eigenschaften beim Waschen untersucht.

55 Dazu wurde eine Schaffell-Probe mit natürlicher Verschmutzung bei 30°C 30 min lang unter ständigem Bewegen in wäßriger Phase behandelt, die 1,5% RABK enthielt, wie es gemäß den Beispielen 1 bis 4 erhalten worden war. Danach wurde die Schaffell-Probe dreimal mit Leitungswasser gespült und getrocknet.

60 Die getrocknete Schaffell-Probe wurde zur Ermittlung des Reinigungsergebnisses dreimal mit CHCl₃/MeOH (2 : 1; v/v) extrahiert. Zur quantitativen Bestimmung der Restverschmutzung der Schaffell-Probe wurden die Extrakte vereinigt, und das Extraktionsmittel wurde unter Vakuum vollständig abgedampft. Die gravimetrische Bestimmung ergab, daß eine Reinigungsstufe von 97% erreicht worden war (d. h. 97% des Gesamtschmutzes waren in dem Schritt des Waschens mit der RABK enthaltenden wäßrigen Reinigungsphase entfernt worden, und 3% Restschmutz waren auf der Schaffell-Probe verblieben und erst durch Extraktion mit organischem Lösungsmittel entfernt worden).

65

Beispiele 6 bis 13

Es wurde wie in Beispiel 5 vorgegangen. Die verwendeten Materialproben, die zusätzlich angewendeten Verschmutzungen, die Reinigungstemperaturen und das Reinigungsergebnis (definiert wie in Beispiel 5) sind in

der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Bsp.	Materialprobe	Verschmutzung (% a)	Temp. (°C)	Reinigungs- stufe (%)
5	Schaffell	natürlich	30	97
6	Schaffell	Lanolin 10	30	95
7	Baumwollstoff	künstl. Fett b) 10	30	85
8	Baumwollstoff	Blut	25	93
9	Sand (φ 0,8-1mm)	Rohöl 6	30	97
10	Phenyl-Formaldehyd- Kunststoff	künstl. Fett b) 10	30	99
11	Glasplatte	künstl. Fett b) 10	30	99
12	Natur-Rindleder	künstl. Fett b) 10	30	91
13	Kunstleder	künstl. Fett b) 10	30	95

Anmerkungen zu Tabelle 2:

a) Gewichts-%, bezogen auf das Gesamtgewicht Materialprobe + Verschmutzung
 b) künstl. Fett: 30 Gew.-% Lanolin, 30 Gew.-% Sonnenblumenöl, 40 Gew.-% Rohöl.

Wie sich aus den Beispielen ergibt, zeigt der Rhamnolipid-Alginat-Biopolymer-Komplex ausgezeichnete Reinigungseigenschaften und ist aufgrund der hervorragenden oberflächenaktiven Eigenschaften geeignet, selbst Problemschmutz (künstl. Fett: 30 Gew.-% Lanolin, 30 Gew.-% Sonnenblumenöl, 40 Gew.-% Rohöl) weitgehend aus Stoffen, Leder, Kunstleder bzw. von Materialoberflächen zu entfernen. Darüberhinaus zeigt der erfindungsgemäße Rhamnolipid-Alginat-Biopolymer-Komplex keine reizende Wirkung auf der Haut und ist im Hinblick auf seine keinen Reiz bewirkenden Eigenschaften herkömmlichen chemischen Tensiden überlegen.

Patentansprüche

1. Zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigtes Bakterium des Genus *Pseudomonas*, erhältlich aus Bodenproben aus dem Erdöl-Fördergebiet Borislav, westliche Ukraine, durch Kultivieren in Schrägagar-Röhrchen oder auf Agar-Platten in einer Nährbouillon der Zusammensetzung (Mengenangaben in g/l): Mannit: 20,0; NaNO₃: 10,0; CaCl₂ · H₂O: 0,1; MgSO₄ · H₂O: 0,4; Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB): 0,2; Methylenblau 0,005; N₂HPO₄ · 2 H₂O: 0,44; KH₂PO₄: 0,34; Agar: 15,0; Spurensalze (2 ml/l): FeSO₄ · 7 H₂O: 2,0; MnSO₄ · H₂O: 1,5; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O: 0,6 unter Zusatz von 1,5% Bacto-Agar® bei einem pH-Wert von 7,0.

2. Bakterium nach Anspruch 1 mit folgenden Eigenschaften:

- Individuen: einzellig;
- Form: Stäbchen (siehe Fig. 1);
- Größe Länge 1,5 bis 4,0 µm; Breite: 0,8 bis 0,9 µm;
- Geißeln: polar 1;
- Bewegung: festgestellt (+);
- Gramverhalten: Gram-negativ;

- Lyse durch 3% KOH;
- Aminopeptidase (Cerny): +;
- Sporen: keine (—);
- Oxidase: +;
- 5 — Catalase: +;
- ADH: +;
- NO₂ aus NO₃: +;
- Urease: +;
- Hydrolyse von Gelatine: +;
- 10 — aerob;
- Substratverwertung:
- Adipat: +;
- Citrat: +;
- Malat: +;
- 15 D-Glucose: +;
- Mannitol: +;
- Acetamid: +;
- Geraniol: +;
- Profil der zellulären Fettsäuren: typisch für die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*;
- 20 — partielle Sequenzierung der 16SrDNA ergibt eine hohe Ähnlichkeit mit derjenigen dieser Art.
- 3. Bakterium nach Anspruch 1, erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man ein Bakterium des Genus *Pseudomonas*, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, unter Schütteln auf einem Kulturmedium folgender Zusammensetzung züchtet (Angaben der Mengen in g/l): NaNO₃: 3,0; K₂HPO₄·3 H₂O: 2,0; KH₂PO₄: 1,5; MgSO₄·7 H₂O: 0,5; Na-citrat: 5,0; FeSO₄·7 H₂O: 0,0005; CaCl₂: 0,5; Kohlenstoffquelle: 20,0.
- 25 4. Bakterium nach einem oder mehreren der Patentansprüche 1 bis 3, nämlich *Pseudomonas aeruginosa* ID 96-115, hinterlegt bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH am 23. Februar 1996 unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554.
- 5. Verfahren zur Gewinnung eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* nach Patentanspruch 1, Patentanspruch 2 oder Patentanspruch 4 aus Bodenproben aus dem Erdöl-Fördergebiet Borislav, westliche Ukraine, wobei das Verfahren den Schritt des Kultivierens des Bakteriums in Schrägagar-Röhrchen oder auf Agar-Platten in einer Nährbouillon der Zusammensetzung (Mengenangaben in g/l): Mannit: 20,0; NaNO₃: 10,0; CaCl₂·2 H₂O: 0,1; MgSO₄·7 H₂O: 0,4; Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB): 0,2; Methylenblau: 0,005; Na₂HPO₄·2 H₂O: 0,44; KH₂PO₄: 0,34; Agar: 15,0; Spurensalze (2 ml/l): FeSO₄·7 H₂O: 2,0; MnSO₄·H₂O: 1,5; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O: 0,6 unter Zusatz von 1,5% Bacto-Agar® bei einem pH-Wert von 7,0 umfaßt.
- 30 6. Verfahren zur Vermehrung eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas* nach einem oder mehreren der Patentansprüche 1 bis 4, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, daß man
 - ein wäßriges, mindestens eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, mindestens eine assimilierbare Stickstoffquelle und an sich bekannte Nährsalze in geeigneten Konzentrationen enthaltendes Nährmedium herstellt und dieses sterilisiert;
 - das so erhaltene Nährmedium mit einem Bakterium nach einem oder mehreren der Patentansprüche 1, 2 oder 4 beimpft und das Bakterium des Genus *Pseudomonas* bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5;
 - und bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 35°C;
 - aerob in bewegter Submerskultur züchtet.
- 35 7. Verfahren nach Patentanspruch 6, worin als assimilierbare Kohlenstoffquelle eine oder mehrere Verbindungen aus der aus Glucose, Xylose, Maltose, Saccharose, Mannit, Glycerin, Ethanol, n-Paraffine, Natrium-citrat, Natriumacetat, Natriumsuccinat und Fettsäureester bestehenden Gruppe verwendet werden.
- 8. Verfahren nach Patentanspruch 7, worin als Kohlenstoffquelle ein oder mehrere pflanzliche Öle verwendet werden, bevorzugt Rapsöl.
- 9. Verfahren nach Patentanspruch 7, worin als Kohlenstoffquelle Abfälle aus der Margarine-Produktion verwendet werden.
- 40 10. Verfahren nach einem oder mehreren der Patentansprüche 6 bis 9, worin der pH-Wert im Bereich von 6,8 bis 7,2 liegt und/oder die Temperatur im Bereich von 25 bis 30°C liegt.
- 11. Verfahren nach einem oder mehreren der Patentansprüche 6 bis 10, worin als Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ID 96-115, hinterlegt bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH am 23. Februar 1996 unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554, eingesetzt wird.
- 45 12. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen unter Fermentation eines zur Erzeugung von Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexen befähigten Bakteriums des Genus *Pseudomonas*, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, daß man
 - ein wäßriges, mindestens eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, mindestens eine assimilierbare Stickstoffquelle und an sich bekannte Nährsalze in geeigneten Konzentrationen enthaltendes Nährmedium herstellt und dieses sterilisiert;
 - das so erhaltene Nährmedium mit einem Bakterium des Genus *Pseudomonas* nach einem oder mehreren der Patentansprüche 1, 2, 3 oder 4 beimpft;
 - das Bakterium des Genus *Pseudomonas* bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 und bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 35°C aerob in bewegter Submerskultur züchtet;

— die Zellen des Bakteriums des Genus *Pseudomonas* auf an sich bekannte Weise von dem wäßrigen Medium abtrennt; und gegebenenfalls

— die Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe aus dem zellfreien wäßrigen Medium gewinnt.

13. Verfahren nach Patentanspruch 12, worin als assimilierbare Kohlenstoffquelle eine oder mehrere Verbindungen aus der aus Glucose, Xylose, Maltose, Saccharose, Mannit, Glycerin, Ethanol, n-Paraffine, Natriumcitrat, Natriumacetat, Natriumsuccinat und Fettsäureester bestehenden Gruppe verwendet werden. 5

14. Verfahren nach Patentanspruch 13, worin als Kohlenstoffquelle ein oder mehrere pflanzliche Öle verwendet werden, bevorzugt Rapsöl.

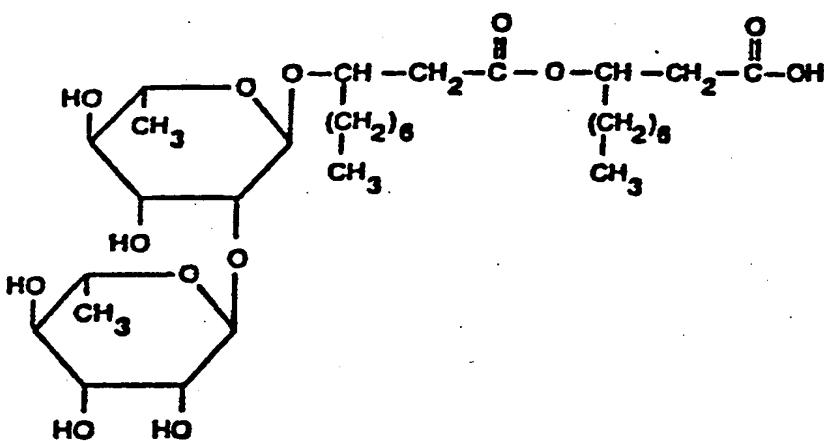
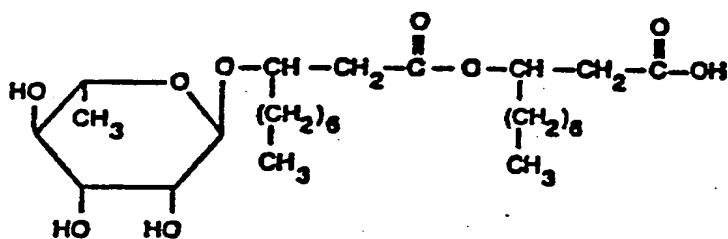
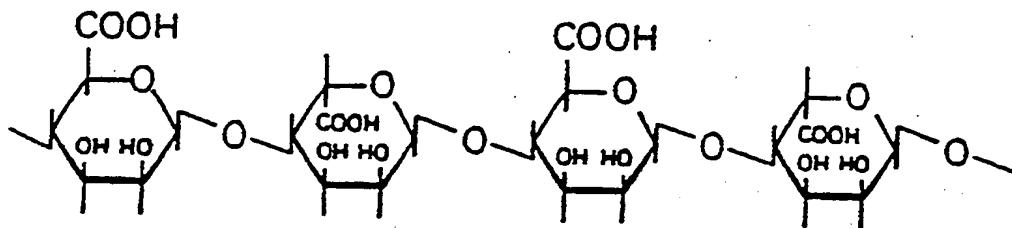
15. Verfahren nach Patentanspruch 13, worin als Kohlenstoffquelle Abfälle aus der Margarine-Produktion verwendet werden. 10

16. Verfahren nach einem oder mehreren der Patentansprüche 12 bis 15, worin als Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ID 96-115, hinterlegt bei der DSMZ-Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH am 23. Februar 1996 unter der Hinterlegungsnummer DSM 10554, eingesetzt wird. 15

17. Verfahren nach einem oder mehreren der Patentansprüche 12 bis 16, worin die Abtrennung des Bakteriums von dem wäßrigen Medium mittels Zentrifugation und/oder Membranfiltration erfolgt. 15

18. Verfahren nach einem oder mehreren der Patentansprüche 12 bis 17, worin die Gewinnung des Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexes aus dem zellfreien Medium mittels Gefriertrocknen oder Ausfällen aus der Lösung, vorzugsweise durch Abdampfen des wäßrigen Mediums oder durch Zusatz eines Fällungsmittels, erfolgt. 20

19. Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex aus Bausteinen der Strukturen



20. Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex nach Patentanspruch 19, worin zwei Rhamnolipid-Komponenten der Strukturen RL I und RL II und eine Alginatpolymer-Komponente der Struktur Alg gemäß Patentanspruch 20 enthalten sind. 65

21. Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex nach ein m oder m hreren der Patentansprüche 19 und 20,

herstellbar nach dem V. ~~W.~~ nach Patentanspruch 12.

5 22. Einen oder mehrere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) nach einem oder mehreren der Patentansprüche 19 bis 21 enthaltende wäßrige Konzentrate, worin der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) im Bereich von 6,0 bis 12,0 g/l liegt.

10 23. Einen oder mehrere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) nach einem oder mehreren der Patentansprüche 19 bis 21 enthaltende wäßrige Emulsionen, worin der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) im Bereich von 0,05 bis 5 Gew.-% liegt.

15 24. Einen oder mehrere Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(e) nach einem oder mehreren der Patentansprüche 19 bis 21 enthaltende wäßrige Lösungen, worin der Gehalt an einem oder mehreren Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplex(en) im Bereich von 0,1 bis 15 Gew.-% liegt.

20 25. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Reinigung von Textilien.

25 26. Verwendung nach Patentanspruch 25, worin die Textilien aus Wolle, Fell, Leder, Kunstleder, Baumwolle, Seide, Kunstseide oder Leinen bestehen.

30 27. Verwendung nach Patentanspruch 25 oder Patentanspruch 26, worin die durch Reinigen zu beseitigende Verschmutzung pflanzliche(s), tierische(s) oder mineralische(s) Fett(e), pflanzliche(s), tierische(s) oder mineralische(s) Öl(e), Lanolin und/oder Blut umfaßt.

35 28. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Reinigung von Bodenmaterial wie beispielsweise Erde, Sand, Kehrgut, Gestein, o. ä.

40 29. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Reinigung von Wasser.

45 30. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Reinigung von Anlagen, Maschinen, Maschinenteilen, Werkzeugen und Instrumenten.

50 31. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Reinigung ölverschmutzter Tiere.

55 32. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Herstellung lebensmittelchemischer Emulsionen.

60 33. Verwendung eines Konzentrats, einer Emulsion oder einer Lösung nach einem der Patentansprüche 22 bis 24 zur Herstellung kosmetischer Emulsionen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

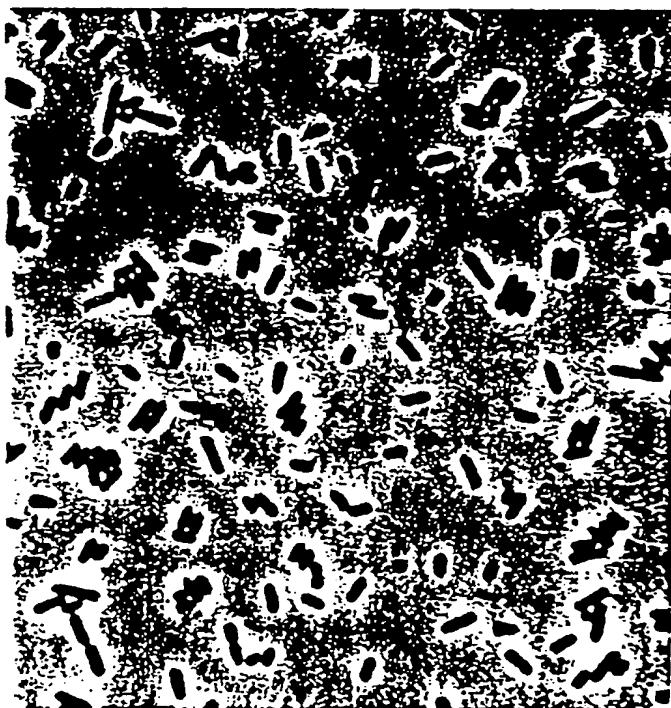
55

60

65

- Leerseite -

Vergrößerung: 2000 x



FIGUR 1

XP-002084012

PL

STN File Supplier, Karlsruhe (DE)
CA COPYRIGHT 1998 ACS

AN 116:180940 CA
TI Stable cosmetic lotions containing ascorbic acid 2-phosphate sodium salt and polyalcohols
IN Matsura, Ichiro; Kizaki, Yoshiho
PA Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan
SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 3 pp.
CODEN: JKXXAF
PI JP 03275610 A2 19911206 Heisei
AI DE 99-13629 19900323
DT Patent
LA Japanese
IC ICM A61K007-00
CC 62-4 (Essential Oils and Cosmetics)
Section cross-reference(s): 16
AB Cosmetic lotions (neutral or weakly acidic) contain 0.05-3.0 wt.% L-ascorbic acid 2-phosphate Na salt and 1-20 wt.% polyalcs. The cosmetics are stable and show skin-lightening and moisturizing effects. *Pseudomonas azotocolligans* was stirred with L-ascorbic acid, K4P207, Nissan Nyneen S-215, xylene, and an acetate buffer at 40.degree. and pH .apprx.4.0 for 36 h to manuf. L-ascorbic acid 2-phosphate (I), which was refluxed with aq. NaOH and EtOH to give 71% I Na salt. Lactic acid 0.05, Na lactate 0.45, L-serine 0.3, methylparaben 0.1, propylene glycol 8.5, I Na salt 83.87, polyoxyethylene glyceryl pyroglutamate isostearate diester 0.5, perfumes 0.03, and modified EtOH 8.0 wt.% were mixed to give a cosmetic lotion (pH 5).
ST lotion skin lightening polyalc ascorbate; ascorbate phosphate polyalc skin lightening
IT Alcohols, biological studies
RL: BIOL (Biological study)
IT Cosmetics
IT 23313-12-4P, L-Ascorbic acid 2-phosphate
IT 109620-90-8P, L-Ascorbic acid 2-phosphate sodium salt
IT 56-81-5, Glycerin, biological studies 57-55-6, Propylene glycol, biological studies 107-88-0, 1,3-Butylene glycol
IT (polyhydric, skin-lightening cosmetic lotions contg. ascorbic acid phosphate sodium salt and, stable)
IT (skin-lightening, contg. ascorbic acid phosphate sodium salt and polyalcs., stable)
IT (manuf. and salt formation of, with sodium hydroxide for skin lightening cosmetics)
IT (prepn. of, skin-lightening cosmetic lotions contg. polyalcs. and, stable)
IT (skin-lightening cosmetic lotions contg. ascorbic acid phosphate sodium salt and, stable)

BEST AVAILABLE COPY



THIS PAGE BLANK (USPTO)